

ШАТОХИНА

Нина Сергеевна

**ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ ИЗОКСАЗОЛЫ НА ОСНОВЕ
ХЛОРАЛКЕНОВ И НИТРИЛОКСИДОВ.
СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ**

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского
Сибирского отделения РАН

Научный руководитель **Кондрашов Евгений Владимирович**
кандидат химических наук,
ИрИХ СО РАН

Официальные оппоненты: **Волчо Константин Петрович**
доктор химических наук, профессор РАН
ФГБУН Новосибирский институт
органической химии им. Н.Н. Ворожцова
СО РАН, отдел медицинской химии,
лаборатория физиологически активных
веществ, главный научный сотрудник

Сокольникова Татьяна Викторовна
кандидат химических наук,
ФГБОУ ВО «Иркутский государственный
университет», кафедра теоретической и
прикладной органической химии и
полимеризационных процессов, доцент

Ведущая организация ФГБОУ ВО «Воронежский
государственный университет»

Защита состоится 20 декабря 2022 года в 9 часов на заседании
диссертационного совета 24.1.165.01 на базе Иркутского института химии им. А. Е.
Фаворского СО РАН по адресу: 664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной-технической библиотеке
Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН и на сайте
<http://www.irkinstchem.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу:
664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ученому секретарю диссертационного совета;
e-mail: dissovet@irioch.irk.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.х.н.

Арбузова Светлана Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Изоксазолы представляют собой интересный и весьма перспективный класс 5-членных гетероциклических соединений для синтетической органической химии, а также для медицинской и фармацевтической химии. Изоксазольный цикл является известным фармакофором: среди синтезированных производных изоксазолов найдены и введены в медицинскую практику антибактериальные препараты (сульфафуразол, сульфаметоксазол, оксациллин), нестероидные противовоспалительные средства ряда коксидов (Валдекоксид, Парексид), базисный противоревматический препарат (Лефлуномид), включенный в перечень ЖНВЛП. Известны гербициды, пестициды, потенциальные противовирусные препараты и цитостатики, содержащие изоксазольный цикл. В обзорной работе журнала *Journal of Medicinal Chemistry* отмечается, что изоксазольный цикл занимает 33 место из ста малых циклов по частоте использования в лекарствах.

В настоящее время из природных объектов выделено множество изоксазолов и дигидроизоксазолов, обладающих высокой биологической активностью. Например, циклосерин – антибиотик широкого спектра действия, продуцируемый актинобактериями *Streptomyces orchidaceus*; нейротоксины (иботеновая кислота и мусцимол) содержатся в грибах семейства *Amanitaceae* (мухомор).

С другой стороны, органическая химия изоксазолов весьма разнообразна. Помимо реакций заместителей в боковой цепи, внимание исследователей привлекают различные способы трансформации изоксазольного цикла: рециклизация в азирины под действием солей железа(II), перегруппировка Боултона-Катрицкого, фотохимические и термические перегруппировки. Каталитическое восстановительное раскрытие изоксазольного цикла приводит к ценным полупродуктам – β -аминоенонам, что используется, например, при получении синтетического витамина В12. Таким образом, разработка новых способов получения изоксазолов и изучение их свойств представляет собой актуальную задачу.

Одним из распространенных способов построения изоксазольного цикла является циклоприсоединение нитрилоксидов к алкенам, содержащим уходящую группу, например, атом галогена. В литературе такие реакции описаны в основном для активированных галогеналкенов, то есть содержащих поляризованную двойную C=C-связь. Циклоприсоединение нитрилоксидов к малополярным хлоралкенам изучено ограниченно. В то же время, такие алкены, как 1,3- и 2,3-дихлорпропены, 1,3-дихлорбутен-2 являются отходами хлорорганических производств эпихлоргидрина и хлоропрена, требующими рационального использования или утилизации.

Исследования проводились в соответствии с планами НИР Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского (ИрИХ) СО РАН (номера государственной регистрации АААА-А16-116112510004-0 и 121021600264-5).

Цель работы заключалась в создании подходов к функционализированным изоксазолам, обладающим практически полезными свойствами, на основе реакций нитрилоксидов с хлорсодержащими алкенами – отходами хлорорганической промышленности. Для достижения поставленных целей решались следующие задачи:

- 1) Установить регионаправленность циклоприсоединения нитрилоксидов к 1,3- и 2,3-дихлорпропенам, 1,3-дихлорбут-2-ену, бис(2-хлораллил)сульфиду. Определить особенности протекания реакций, найти оптимальные методы синтеза целевых изоксазолов.
- 2) Вовлечь бис(изоксазолилметил)сульфиды в реакции конденсации с 1,2-дикарбонильными соединениями.
- 3) Используя синтетический потенциал полученных 5-(хлорметил)изоксазолов, синтезировать новые водорастворимые производные изоксазолов, содержащих фрагменты силатрана, аминокислот, аминов, оценить их антимикробную активность и токсичность.

Научная новизна и практическая значимость работы. Изучено циклоприсоединение нитрилоксидов к хлоралкенам с различной стерической доступностью двойной связи. Установлено, что реакции с терминальными алкенами, таким как 2,3-дихлорпропен, бис(2-хлораллил)сульфид региоспецифично приводят к 3,5-дизамещенным изомерам изоксазолов. В отличие от этого, взаимодействие нитрилоксидов с интернальными алкенами – 1,3-дихлорпропеном и 1,3-дихлорбут-2-еном – протекает с образованием смеси региоизомеров. Найдено, что соотношение изомерных изоксазолинов, образующихся в реакции нитрилоксидов с 1,3-дихлорпропеном, близко к эквимольному и зависит от объёма заместителя в нитрилоксиде. Циклоприсоединение (2,6-дихлорфенил)нитрилоксида к 1,3-дихлорбут-2-ену протекает более селективно и приводит к смеси 4- и 5-(хлорметил)-изоксазолов в соотношении 97:3.

На основе взаимодействия 2,3-дихлорпропена с альдоксимами в присутствии различных окислителей разработан удобный однореакторный способ получения 5-(хлорметил)изоксазолов – ценных строительных блоков для синтеза биологически активных соединений. Синтетический потенциал 5-(хлорметил)изоксазолов продемонстрирован на примере их реакций с 3-(аминопропил)силатраном, аминокислотами и другими N- и S-нуклеофилами.

Основно-катализируемой конденсацией бис(изоксазол-5-илметил)сульфидов с диэтилоксалатом получены неизвестные ранее 2,5-бис(изоксазол-5-ил)-3,4-дигидрокситиофены – вещества, характеризующиеся высокими молярными коэффициентами экстинкции (~40 000) в ближней УФ-области (330-350 нм).

Проведена оценка антимикробной активности новых синтезированных производных изоксазолов в отношении непатогенных микроорганизмов различных таксонометрических групп. Определена зависимость бактериостатического действия от природы заместителей в положениях 3 и 5 цикла. Найдены соединения-лидеры, подавляющие размножение микроорганизмов в низких

концентрациях (0.06 – 3 мкг/мл). Исследование острой токсичности показало, что полученные соединения-лидеры нетоксичны (относятся к 4 классу опасности по ГОСТ 12.1.007-76), а также обладают низкой цитотоксичностью.

Достоверность и надежность полученных результатов обеспечена использованием современных методов анализа новых соединений с помощью спектроскопии ЯМР [^1H , ^{13}C], в том числе, двумерными гомо- и гетероядерными методами (COSY, NOESY, HMBC, HSQC), ИК спектроскопии и хроматомасс-спектрометрии, рентгеноструктурного анализа.

Личный вклад автора. Все изложенные в диссертации результаты получены лично автором или при его непосредственном участии. Соискатель самостоятельно планировал и выполнял эксперименты, участвовал в интерпретации экспериментальных данных, в подготовке и написании публикаций.

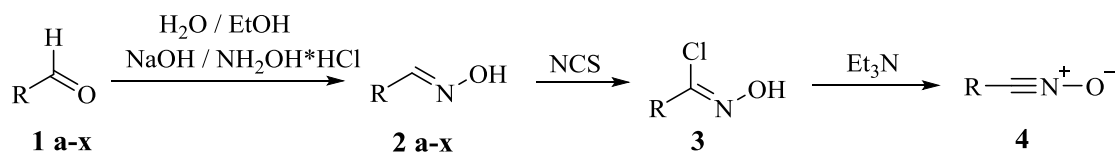
Апробация работы и публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, а также тезисы 5 докладов. Отдельные результаты работы были представлены на XXIX Российской молодежной научной конференции с международным участием «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2019), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019), I Всероссийской школе-конференции по медицинской химии (Новосибирск, 2021), Российском микробиологическом конгрессе (Псков, 2021), Международной научно-технической конференции «Современные технологии и научно-технический прогресс» (Ангарск, 2021).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 148 страницах. Первая глава (литературный обзор) посвящена обобщению и анализу имеющейся информации о способах использования нитрилоксидов для синтеза гетероциклических соединений, а также кратко проиллюстрированы примеры биологически активных соединений, содержащих изоксазольный цикл; результаты собственных исследований обсуждаются во второй главе; экспериментальные подробности приведены в третьей главе. Завершается рукопись выводами и списком цитируемой литературы (162 источника).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Циклоприсоединение нитрилоксидов к 2,3-дихлорпропену (2,3-ДХП)

В работе мы использовали распространенный способ получения нитрилоксидов, основанный на дегидрохлорировании хлороксимов **3**. Исходные оксимы **2** и хлороксимы **3** синтезировали по литературным методикам согласно Схеме 1.

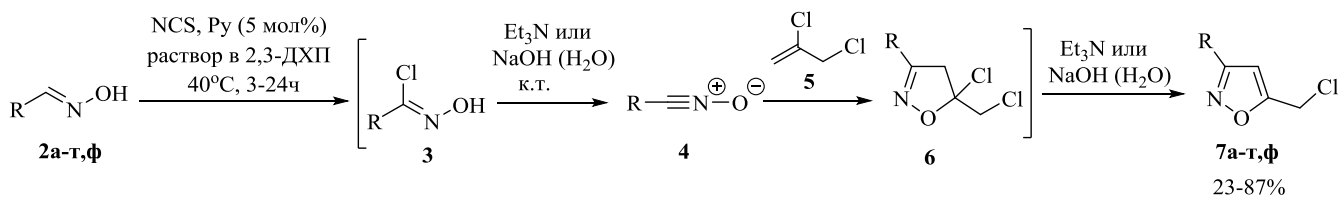


1, 2: R = *n*-C₇H₁₅ (**a**), цикло-C₆H₁₁ (**б**), C₆H₅ (**в**), PhCH=CH (**г**), 4-FC₆H₄ (**д**), 4-ClC₆H₄ (**е**), 2-ClC₆H₄ (**ж**), 4-BrC₆H₄ (**з**), 4-MeC₆H₄ (**и**), 4-NCC₆H₄ (**к**), 4-MeOC₆H₄ (**л**), 2-MeOC₆H₄ (**м**), 4-НОС₆H₄ (**н**), 2-НОС₆H₄ (**о**), 4-NO₂C₆H₄ (**п**), 2-NO₂C₆H₄ (**р**), 2,6-Cl₂C₆H₃ (**с**), 5-NO₂-фуран-2-ил (**т**), 4-НО-3-МеОС₆H₃ (**у**), Ме (**ф**), 2-НО-4-МеОС₆H₃ (**х**).

На нескольких примерах мы показали, что циклоприсоединение нитрилоксидов **4** к 2,3-ДХП в растворе ТГФ или диоксана протекает региоселективно, с образованием только 5-(хлорметил)изоксазолов **7**. Однако, хемоселективность процесса оказалась невысокой, реакция сопровождалась значительной димеризацией **4** в фуроксаны (1,2,5-оксадиазол-2-оксиды).

Оптимизируя условия реакции, мы обнаружили, что использование избытка субстрата приводит к увеличению выхода целевых изоксазолов **7**. В ходе дальнейшей оптимизации условий была упрощена процедура синтеза и исключено использование органического растворителя. В итоге мы предложили простой одnoreакторный способ получения 5-(хлорметил)изоксазолов **7** напрямую из альдоксимов **2** и 2,3-ДХП, используя его как растворитель и реагент (Схема 2).

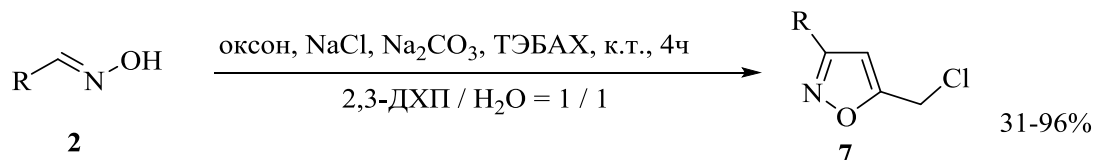
Схема 2



Большой избыток субстрата положительно сказывается на хемоселективности: образования фуроксанов не замечено, а выходы изоксазолов **7** составили до 87%. Процессы хлорирования оксимов **2** и дегидрохлорирования хлороксимов **3** проводили последовательно в одном реакторе без выделения промежуточных соединений. По окончании реакции избыток 2,3-ДХП регенерируется отгонкой и может быть использован повторно. Наименьшие выходы были получены для реакций с участием (гидрокси)фенилнитрилоксидов **4н,о,у** что связано, по-видимому, с их низкой стабильностью в условиях реакции.

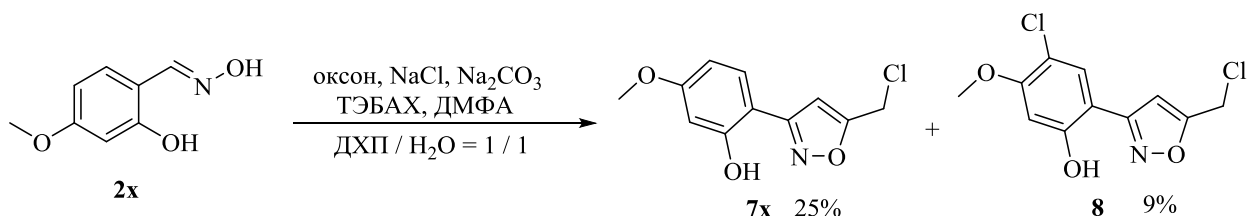
Несмотря на достигнутый успех, выходы некоторых изоксазолов **7** оказались весьма умеренными. Кроме того, используемые реагенты NCS и Et₃N нельзя отнести к дешевым и экологически безопасным. В связи с этими, был исследован альтернативный вариант окисления оксимов до нитрилоксидов с использованием неорганического окислителя, оксона.

Использование системы оксон–NaCl–Na₂CO₃ оказалось эффективным. Реакцию проводили в избытке субстрата 2,3-ДХП в двухфазной системе 2,3-ДХП – вода в присутствии катализатора межфазного переноса ТЭБАХ (Схема 3).



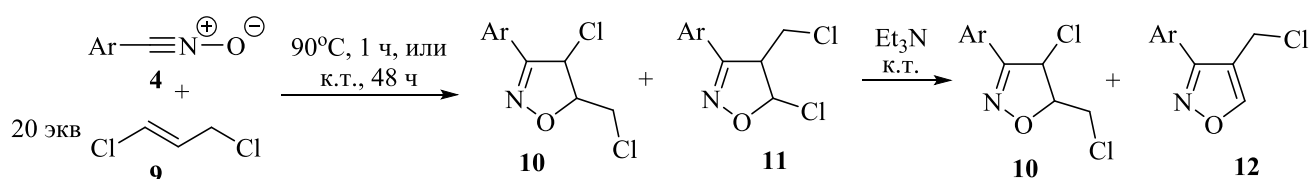
R = *цикло*-C₆H₁₁, C₆H₅, 4-BrC₆H₄, 4-NCC₆H₄, 4-MeOC₆H₄, 4-HOC₆H₄, 4-NO₂C₆H₄, 5-NO₂-фуран-2-ил, 4-НО-3-МеОС₆Н₃, 2-НО-4-МеОС₆Н₃.

После завершения реакции избыток 2,3-ДХП регенерируется отгонкой. Преимуществом предложенного метода является меньшее время реакции и более высокие выходы целевых изоксазолов **7**. Следует отметить, что метод малоприменим для оксимов, содержащих два электронодонорных заместителя в бензольном кольце из-за протекания побочной реакции электрофильного хлорирования бензольного кольца (Схема 4). Продукты **7x** и **8** были выделены в индивидуальном виде методом препаративной колоночной хроматографии.



2. Циклоприсоединение нитрилоксидов к 1,3-дихлорпропену (1,3-ДХП)

Регионаправленность циклоприсоединения нитрилоксидов к 1,3-ДХП неочевидна и определяется балансом электронных и стерических эффектов заместителей в субстрате. Нитрилоксиды **4** предварительно получали в индивидуальном виде дегидрохлорированием хлороксимов **3** и затем немедленно использовали в реакции с избытком 1,3-ДХП (Схема 5).

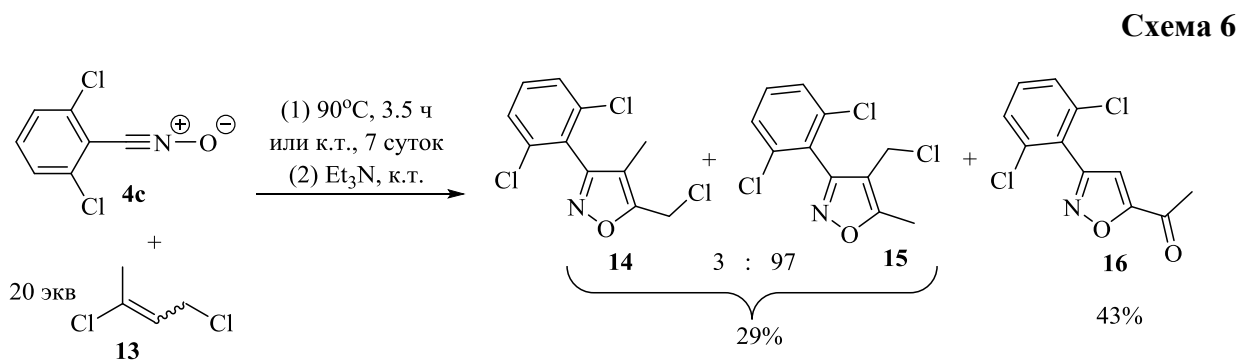


Ar	Отношение 10:11 в реакц. смеси	Выход, %	
		10	12
4-ClC ₆ H ₄ (e)	48 : 52	27	30
2-ClC ₆ H ₄ (ж)	47 : 53	24	40
2,6-Cl ₂ C ₆ H ₃ (с)	35 : 65	29	53

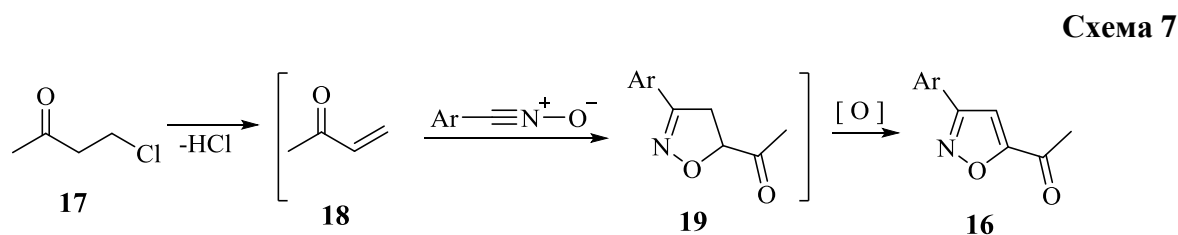
Реакция приводит к смеси 5-хлорметил- и 4-(хлорметил)изоксазолинов (**10** и **11**). Как видно из схемы, доля изоксазолина **11** растет с увеличением объема заместителя при нитрилоксидной группе. Из-за различной СН-кислотности в положении 5 цикла **10** и в положении 4 соединения **11** скорость дегидрохлорирования изоксазолинов существенно отличается. Так, аддукты **11** при добавлении Et₃N сразу переходят в **12**, тогда как 5-(хлорметил)изоксазолины **10** ароматизируются в **7** только при длительном нагревании реакционной смеси. Индивидуальные продукты **10** и **12** выделены методом препаративной колоночной хроматографии. Выход продуктов циклоприсоединения зависит от устойчивости нитрилоксидов к димеризации. Так, реакция нитрилоксида **4с** дает высокий суммарный выход **10с** и **12с**, тогда как выход с менее устойчивыми нитрилоксидами **4е,ж** ниже.

3. Циклоприсоединение нитрилоксида **4с** к 1,3-дихлорбутену-2 (1,3-ДХБ)

В связи с тем, что 1,3-ДХБ является одним из отходов промышленного производства хлоропрена, представляло интерес изучить возможность синтеза изоксазолов на его основе, а также определить региоселективность циклоприсоединения нитрилоксидов. Исследование было проведено на примере реакции индивидуального нитрилоксида **4с** в растворе 1,3-ДХБ (20 экв) (Схема 6).



Как видно из схемы, введение метильной группы в структуру 1,3-ДХП существенно изменяет региоселективность циклоприсоединения. Кроме того, наряду с целевыми продуктами **14** и **15**, основным продуктом реакции неожиданно оказался 5-(ацетил)изоксазол **16**. Мы предположили следующую схему его образования (Схема 7).



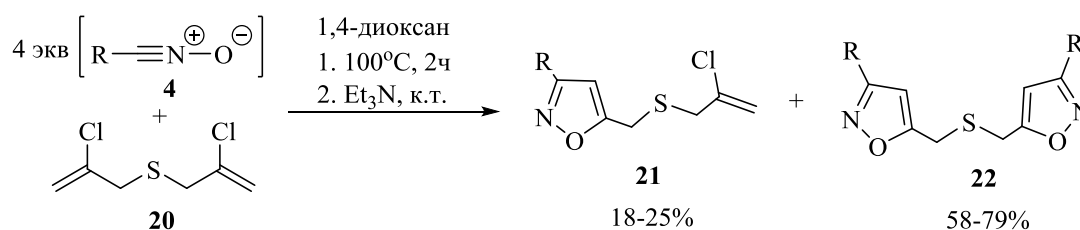
При анализе спектра ЯМР ¹N исходного 1,3-ДХБ была обнаружена примесь (~3 мол %), имеющая одинаковую с 1,3-ДХБ температуру кипения, дающая сигналы с хим. сдвигами 2.20 (с), 2.93 (т), 3.73 (т) м.д., что совпадает с опубликованным спектром 4-хлорбутан-2-она **17**.

Дегидрохлорирование **17** с последующим циклоприсоединением и окислительной ароматизацией приводит к изоксазолу **16**. Учитывая, что в реакции используется большой избыток 1,3-ДХБ, количество примеси **17** оказывается соизмеримым с количеством взятого в реакцию нитрилоксида **4с**.

4. Циклоприсоединение нитрилоксидов к бис(2-хлораллил)сульфиду **20**

Хлораллилсульфиды – первичные полупродукты переработки хлорорганических отходов. Благодаря наличию у двойной связи уходящей группы, такие сульфиды можно рассматривать как легкодоступные синтетические эквиваленты ацетиленовых сульфидов. С целью получения бис(изоксазолилметил)сульфидов в одну препаративную стадию, мы изучили реакции нитрилоксидов **4е,ж,о** с сульфидом **20** (Схема 8).

Схема 8



4, 21, 22: R = 4-ClC₆H₄ (**е**), 2-ClC₆H₄ (**ж**), 2-НОС₆H₄ (**о**).

При комнатной температуре взаимодействие нитрилоксидов **4** с сульфидом **20** протекает медленно (48 ч) и неселективно, с образованием смеси исходного реагента **20** с продуктами циклоприсоединения **21** и **22**, а также фуроксана. Оптимальной конверсии **20** удалось достичь при медленном введении раствора **4** в реакционную смесь при нагревании и использовании 4-кратного мольного избытка нитрилоксида. Лучший выход показал более устойчивый к димеризации нитрилоксид **4ж**, для которого наблюдается полная конверсия сульфида и лучшее мольное соотношение **21ж** : **22ж** = 10 : 90 (препаративный выход **22ж** 79%).

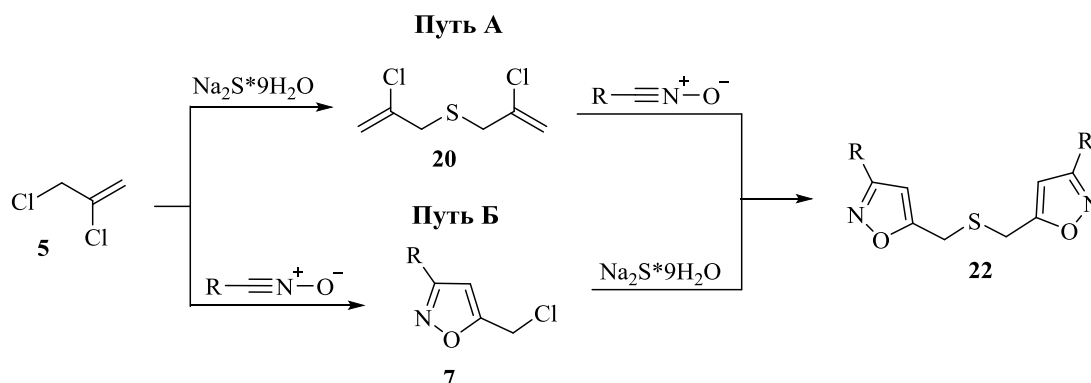
Удовлетворительный выход целевого сульфида **22о** (58%) в реакции 2-(гидрокси)фенилнитрилоксида удалось получить только при 6-кратном мольном избытке **4о**. Эти данные находятся в согласии с полученными нами выше результатами по реакционной способности гидроксифенилсодержащих нитрилоксидов **4н,о,у,х**. Полученные сульфиды **22** могут служить строительными блоками для получения тиофенсодержащих полигетероциклических ансамблей.

5. Альтернативный способ получения бис(изоксазолилметил)сульфидов **22**

Как следует из Главы 4, синтез сульфидов **22** циклоприсоединением нитрилоксидов **4** к бис(2-хлораллил)сульфиду **20** недостаточно эффективен, так как для создания одного изоксазольного цикла расходуется до трёх эквивалентов нитрилоксида. Из одного и того же исходного субстрата – 2,3-ДХП – целевые сульфиды **22** можно получить двумя разными

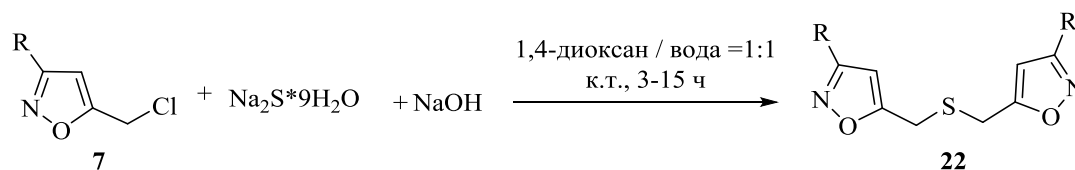
способами: по *пути А* (рассмотрен в Главе 4), и по *пути В* с первоначальным синтезом изоксазолов **7** и далее взаимодействием их с сульфидом натрия (Схема 9).

Схема 9



В Главе 1 мы показали высокую эффективность синтеза изоксазолов **7** из альдоксимов и 2,3-ДХП – первую стадию *пути В*. Далее мы изучили взаимодействие изоксазолов **7** с сульфидом натрия. Оказалось, что целевые сульфиды **22** образуются в мягких условиях с хорошими выходами (Схема 10).

Схема 10

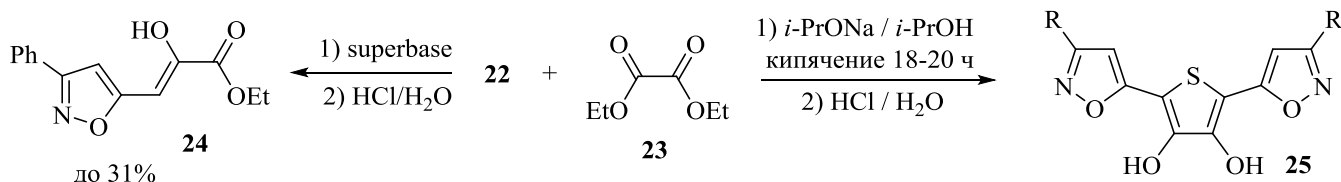


7, 22: R = *n*-C₇H₁₅ (**а**, 61%), Ph (**в**, 80%), 4-ClC₆H₄ (**е**, 90%), 4-MeOC₆H₄ (**л**, 78%)

Таким образом, можно сделать вывод о том, что получение целевых сульфидов **22** по *пути В* оказывается менее трудоёмким, а выходы в расчете на исходный альдоксим более высокими по сравнению с проведением реакции по *пути А*.

6. Конденсация бис(изоксазолилметил)сульфидов **22** с диэтилоксалатом

С целью получения полигетероциклических ансамблей, содержащих изоксазольный и тиофеновый циклы в одной структуре, мы исследовали полученные нами неизвестные ранее сульфиды **22** в реакции конденсации с диэтилоксалатом. Поскольку изоксазол-5-ильный заместитель не является электроноакцепторным, для генерирования карбанионов из сульфидов **22** требуется использование сильных оснований. Так, основности системы MeONa / MeOH недостаточно для катализа таких реакций. В то же время, использование суперосновных сред (KOH / ДМСО, *t*-BuOK / ДМСО) приводит к сильному осмолению и образованию продуктов деструкции типа **24** (Схема 11).



R = *n*-C₇H₁₅ (**a**, 59%), Ph (**b**, 77%), 4-ClC₆H₄ (**e**, 80%), 4-MeOC₆H₄ (**л**, 85%)

Оптимальной системой для проведения реакции оказался изопропилат натрия в изопропанол в условиях длительного кипячения реакционной смеси. Мы нашли, что соединения **25** поглощают УФ излучение в области 330-350 нм с высоким коэффициентом молярной экстинкции (33000–40000), что может найти применение при создании новых материалов.

7. Функционализация 5-(хлорметил)изоксазолов

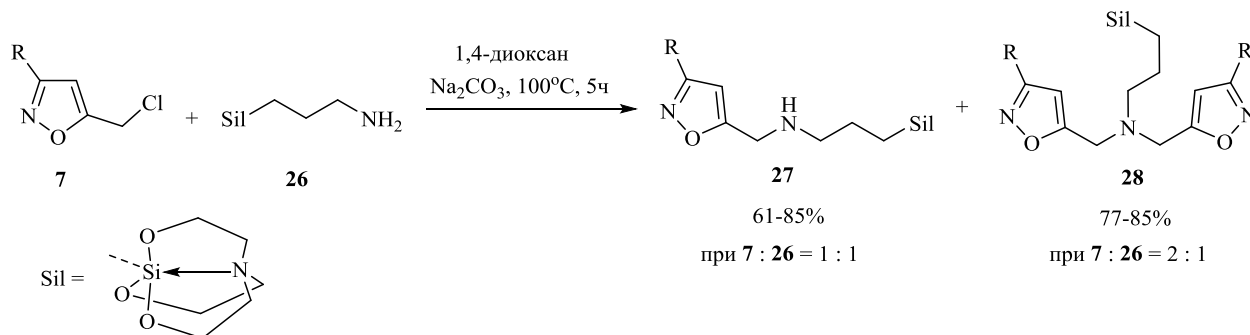
Благодаря наличию в структуре изоксазолов **7** хлорметильной группы бензильного типа, они являются удобными строительными блоками, позволяющими ввести изоксазолилметиленовый фрагмент в различные молекулы. В настоящей главе обсуждается синтез аддуктов изоксазолов **7** с различными S- и N-нуклеофилами.

7.1 Синтез изоксазол-силатрановых гибридов

Известно, что производные силатранов обладают широким спектром биологической активности, в том числе проявляют фунгицидные и антимикробные свойства. В связи с этим, нами были синтезированы неизвестные ранее гибридные молекулы, сочетающие в своей структуре изоксазольный цикл и силатранильный заместитель, и изучены их свойства.

Взаимодействие (3-аминопропил)силатрана **26**, как типичного представителя первичных аминов, с 5-(хлорметил)изоксазолами **7** приводит к смеси моноаддуктов **27** и диаддуктов **28**, при этом образование четвертичных аммониевых солей не наблюдалось (Схема 12).

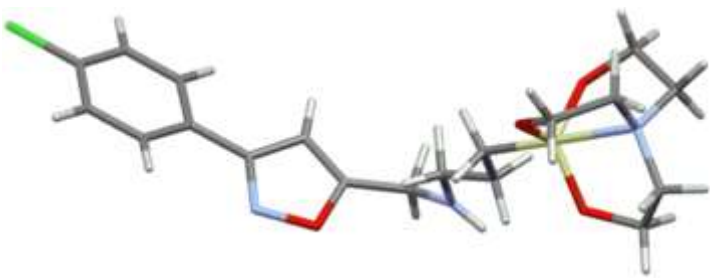
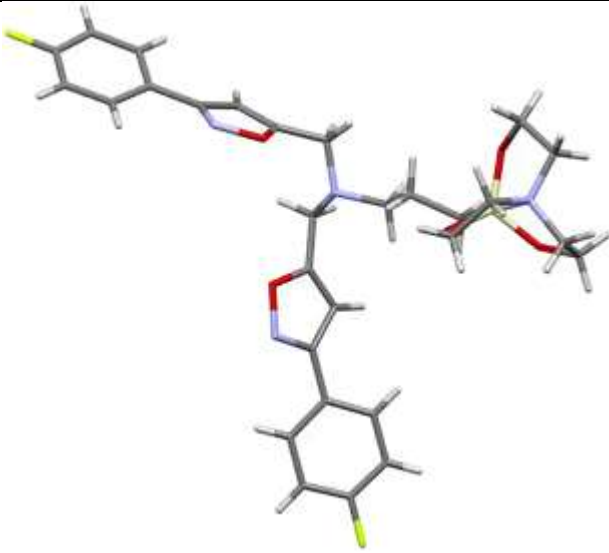
Схема 12



R = *n*-C₇H₁₅ (**a**), цикло-C₆H₁₁ (**б**), PhCH=CH (**г**), 4-FC₆H₄ (**д**), 4-ClC₆H₄ (**е**), 4-MeOC₆H₄ (**л**), 2-HOC₆H₄ (**о**), 4-NO₂C₆H₄ (**п**)

Вследствие большого объёма (3-(арил)изоксазол-5-ил)метильного и силатранильного заместителей возникают стерические препятствия, которые затрудняют синтез третичных аминов **28**. Благодаря этому удаётся контролировать селективность реакции варьированием мольного соотношения реагентов **7** и **26**. Так, для получения преимущественно моноалкилированных производных **27** следует использовать эквимольное количество реагентов, тогда как для диалкилирования требуется двукратный мольный избыток изоксазола **7**. Несмотря на то, что в реакциях не достигается 100%-ная селективность, аддукты **27** и **28** могут быть легко отделены друг от друга колоночной хроматографией на силикагеле вследствие большой разницы факторов удерживания.

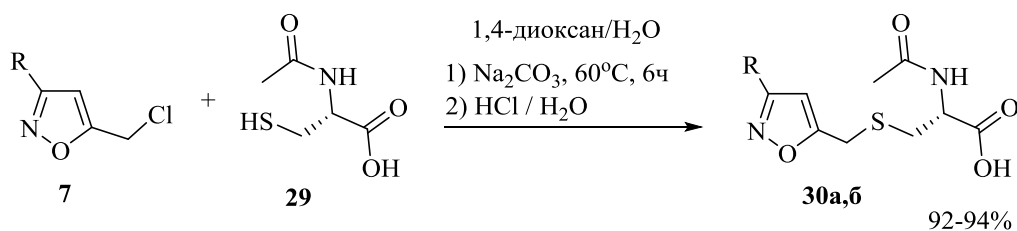
Таблица 1. Структуры соединений **27e** и **28d** по данным PCA и номера CCDC

27e	28d
	
CCDC 1993068	CCDC 1993069

7.2 Синтез изоксазолсодержащих аминокислот

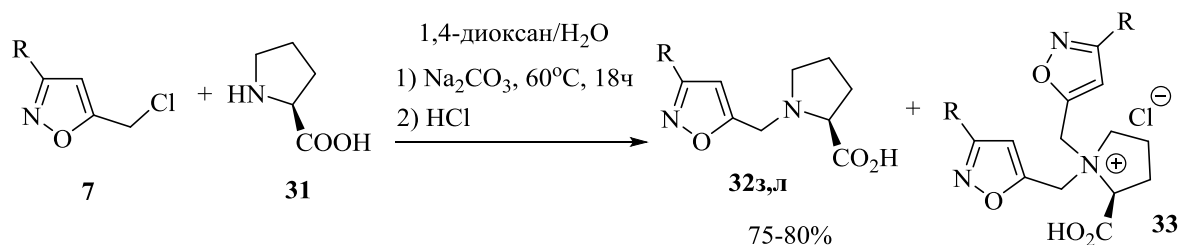
Большой интерес в качестве потенциальных antimicrobных препаратов представляют соединения, сочетающие в одной молекуле изоксазольный цикл и фрагмент аминокислоты. Структуры многих известных антибактериальных, противогрибковых или противопротозойных агентов, выделенных из природных источников либо специально синтезированных, основаны на аминокислотном каркасе. При этом для большинства из них аминокислотный фрагмент имеет решающее значение для проявления их активности, поскольку часто является структурным аналогом интермедиатов аминокислот в различных путях микробного биосинтеза.

Производные N-ацетил-L-цистеина **30a,б** получали путем нуклеофильного замещения атома хлора CH_2Cl -группы в изоксазолах **7л,о** на остаток аминокислоты (Схема 13).



R = 4-MeOC₆H₄ (а), 4-HOC₆H₄ (б).

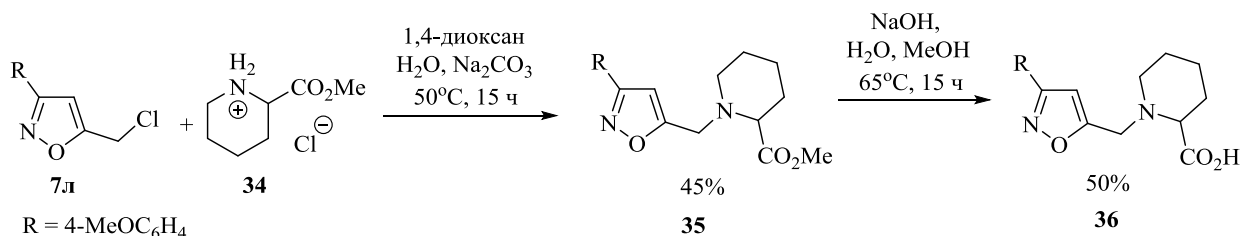
N-Алкилирование L-пролина при эквимольном соотношении реагентов идёт неселективно и целевые N-(изоксазолилметил)пролины **32** содержат до 20 мол % примеси четвертичной аммониевой соли **33** (Схема 14).



R = 4-MeOC₆H₄ (л), 4-BrC₆H₄ (з).

Использование двукратного мольного избытка L-пролина позволяет значительно уменьшить количество соли **33**, однако полностью избежать её образования не удаётся. Продукты **32** и **33** можно легко разделить, используя их сильно отличающуюся растворимость в хлороформе.

Похожим образом получали N-(изоксазолилметил)пиперидин-2-карбоновую кислоту **36**. Цепочку превращений начинали с N-алкилирования коммерчески доступного рацемического гидрохлорида метилпипеколината **34**. Далее полученный эфир **35** очищали флэш-хроматографией и гидролизовали сложноэфирную группу (Схема 15).

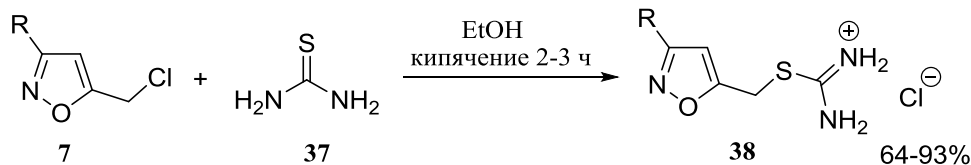


7.3 Синтез водорастворимых аддуктов изоксазолов с тиомочевинной, сульфаниловой кислотой и триэтаноламином

С целью поиска новых водорастворимых производных изоксазолов, которые могут обладать антибактериальной активностью, мы получили аддукты изоксазолов с тиомочевинной,

сульфаниловой кислотой и триэтаноломином. Взаимодействие изоксазолов **7** с тиомочевинной **37** проводили при эквимольном соотношении реагентов. Изотиуруниевые соли **38** легко могут быть выделены в чистом виде благодаря их низкой растворимости в органических растворителях (Схема 16).

Схема 16

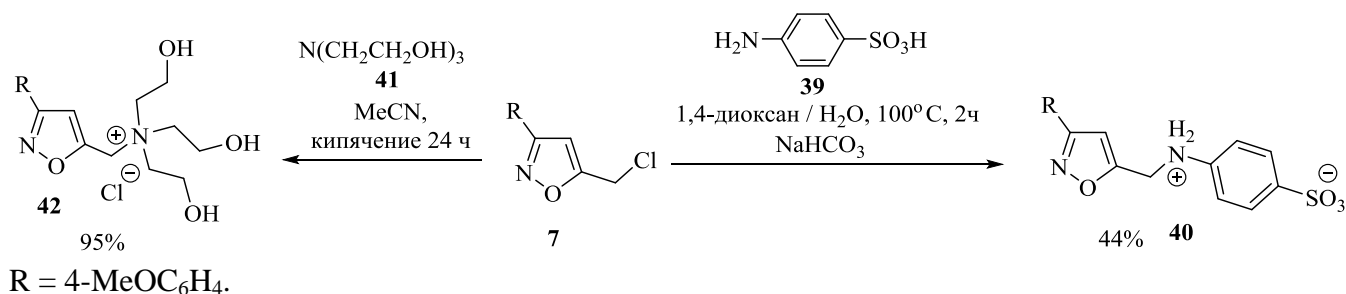


7, 38: R = *n*-C₇H₁₅ (**a**), C₆H₅ (**b**), 4-FC₆H₄ (**d**), 4-ClC₆H₄ (**e**), 4-BrC₆H₄ (**з**), 4-MeC₆H₄ (**и**), 4-NCC₆H₄ (**к**), 4-MeOC₆H₄ (**л**), 2-MeOC₆H₄ (**м**), 4-НОС₆H₄ (**н**), 2-НОС₆H₄ (**о**), 4-NO₂C₆H₄ (**п**), 2-NO₂C₆H₄ (**р**), 2,6-Cl₂C₆H₃ (**с**), 5-(NO₂)фуран-2-ил (**т**), 4-НО-3-МеОС₆H₃ (**у**), 2-НО-4-МеОС₆H₃ (**х**), 2-ОН-4-МеО-5-ClC₆H₂ (**ц**)

Одним из возможных способов использования изотиуруниевых солей является применение их в качестве добавки в электролит при гальваническом никелировании. Так, в соавторстве с сотрудниками АнГТУ показано, что использование добавки соединений **38в,е,л** в концентрации 10-20 мг/л в электролит Уоттса позволяет получать блестящие никелевые покрытия.

Аддукты изоксазола **7л** с триэтаноломином и сульфаниловой кислотой получали согласно Схеме 17. Взаимодействие с триэтаноломином завершается лишь при длительном кипячении в ацетонитриле, приводя к целевой четвертичной соли **42** с высоким выходом. N-Алкилирование сульфаниловой кислоты **39** изоксазолом **7л** проводили в присутствии трехкратного мольного избытка **39** с целью минимизировать процесс двойного алкилирования аминогруппы. Целевой продукт **40** выделяли перекристаллизацией из воды.

Схема 17



8. Оценка антимикробной активности полученных водорастворимых производных изоксазолов¹

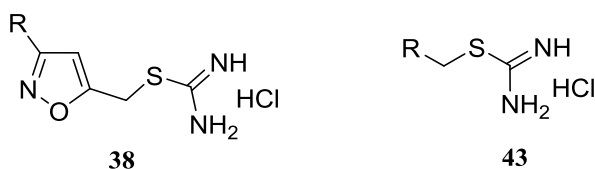
В настоящей работе мы протестировали полученные водорастворимые производные изоксазолов на наличие антимикробной активности. Для скрининга использовался экспрессный диск-диффузионный метод. В качестве тестовых микроорганизмов были взяты штаммы

¹ Работа выполнена д.б.н. Л.А. Беловежец

грамположительных бактерий *Enterococcus durans* В-603, *Bacillus subtilis* В-407 и грамотрицательных *Escherichia coli* В-1238 (Всероссийская коллекция микроорганизмов).

На первом этапе дизайна потенциальных антимикробных соединений, для оценки влияния заместителя в положении 3 изоксазольного цикла на антимикробную активность, мы определили минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) для широкого ряда водорастворимых изотиуруниевых солей **38** (Таблица 2).

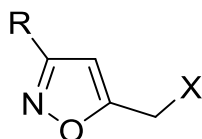
Таблица 2. МИК (мкг/мл) изотиуруниевых солей **38** и **43** в сравнении с оксациллином



№	R	<i>E. durans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
38a	n-C ₇ H ₁₅	25	250	>1000
38в	C ₆ H ₅	125	6.2	>1000
38д	4-FC ₆ H ₄	250	500	>1000
38e	4-ClC ₆ H ₄	125	25	>1000
38з	4-BrC₆H₄	62.5	31.2	31.2
38и	4-MeC ₆ H ₄	62.5	250	250
38к	4-NCC ₆ H ₄	31.2	62.5	125
38л	4-MeOC₆H₄	0.15	3.1	>1000
38м	2-MeOC ₆ H ₄	62.5	31.2	500
38н	4-НОС ₆ H ₄	250	125	500
38о	2-НОС₆H₄	1.6	25	>1000
38п	4-NO ₂ C ₆ H ₄	62.5	>1000	>1000
38р	2-NO ₂ C ₆ H ₄	>1000	500	250
38с	2,6-Cl ₂ C ₆ H ₃	31.2	62.5	125
38т	5-NO₂-фуран-2-ил	25	25	6.2
38у	3-OMe-4-НОС ₆ H ₃	250	>1000	62.5
38х	2-ОН-4-МеОС₆H₃	6.2	25	50
38ц	2-ОН-4-МеО-5-ClC ₆ H ₂	62.5	250	125
43a	Ph	>1000	500	>1000
43б	4-MeOC ₆ H ₄	250	1000	>1000
оксациллин		25	12.5	6.2

Также мы показали, что изотиуруниевый фрагмент не привносит антимикробных свойств. Так, МИК изотиуруниевых солей **43a** и **43б**, не содержащих в своей структуре изоксазольный цикл, оказалась >250 мкг/мл, что говорит об отсутствии антибактериального действия (Таблица 2). Зафиксировав в третьем положении цикла структурные фрагменты, приводящие к наилучшему бактериостатическому действию, мы продолжили варьировать заместитель в положении 5 цикла (Таблица 3).

Таблица 3. МИК (мкг/мл) водорастворимых производных изоксазолов



№	R	X	<i>E. durans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
27л	4-MeOC ₆ H ₄		12.5	6.2	>1000
27п	4-NO ₂ C ₆ H ₄		62.5	62.5	>1000
27е	4-ClC ₆ H ₄		250	125	>1000
30а	4-MeOC ₆ H ₄		0.06	6.2	>1000
30б	4-HOC ₆ H ₄		2.5	2.5	125
32л	4-MeOC ₆ H ₄		0.6	2.5	1.6
32з	4-BrC ₆ H ₄		1.25	0.6	0.6
36	4-MeOC ₆ H ₄		62.5	500	>1000
40	4-MeOC ₆ H ₄		1.25	12.5	12.5
42	4-MeOC ₆ H ₄		0.6	250	12.5
оксациллин			25	12.5	6.2

Из полученных данных следует, что наилучший бактериостатический эффект оказывают изоксазольные производные силатрана **28л**, аминокислот **32** и **36**, сульфаниловой кислоты **40** и четвертичная аммониевая соль **42**. Сравнивая активность соединений **32л** и **36**, интересно отметить, что при изменении размера цикла всего лишь на одну CH₂-группу происходит почти полная потеря антимикробного действия. В рекордно низких концентрациях подавляет рост грам-положительных *E.durans* изоксазол **30а**, найденная для него МИК составила всего 0.06 мкг/мл, что эквивалентно раствору 60 мг соединения **30а** в 1 тонне воды.

Многие из полученных соединений оказались значительно более эффективными бактериостатиками, чем известный изоксазол-содержащий антибиотик оксациллин, взятый в качестве образца сравнения.

9. Оценка токсичности некоторых полученных водорастворимых производных изоксазолов

При оценке перспектив использования молекул-кандидатов в качестве терапевтических агентов важным становится вопрос токсичности исследуемых соединений, так как при высокой токсичности фармакологическое применение таких препаратов затруднительно или невозможно.

9.1 Цитотоксичность²

Для некоторых соединений-лидеров, показавших наилучшую бактериостатическую активность, **38л**, **30а**, **32л**, **40**, **42**, была проведена оценка их цитотоксичности на клетках нормальных фибробластов кожи человека (NAF1nor – первичные фибробласты кожи здорового донора, получены в ИЦиГ СО РАН) в сравнении с оксациллином (Таблица 4).

Таблица 4. Доля живых клеток (в %), определенная через заданное время культивирования при концентрации исследуемых веществ 500 мкг/мл.

	38л	30а	32л	40	42	оксациллин
1 сутки	3	78	54	75	70	56
3 сутки	3	63	37	62	48	40
5 сутки	3	50	30	48	32	36

Все полученные вещества оказались малотоксичными для клеток ($LD_{50} > 500$ мкг/мл), и, за исключением **38л**, менее токсичны, чем известный изоксазол-содержащий антибиотик оксациллин.

9.2 Острая токсичность³

Для соединений **30а**, **32л**, **42** была определена острая токсичность на мышах при пероральном и внутрибрюшинном способах введения веществ в сравнении с оксациллином. Для определения показателей острой токсичности исследуемые вещества в виде водных растворов вводили мышам-самцам и мышам-самкам (по 5 животных в каждой группе) внутривентрикулярно или внутрибрюшинно в возрастающих дозах (Таблица 5).

Таблица 5. Острая токсичность LD_{50} , мг/кг (по ГОСТ 12.1.007-76).

вещество	пероральное введение		внутрибрюшинное введение	
	самцы	самки	самцы	самки
30а	>6000	>6000	1900	1900
32л	>6000	>6000	1500	1500
42	>6000	>6000	165	160

LD_{50} оксациллина так же превышает 6000 мг/кг при пероральном введении.

² работа выполнена в СИФиБР СО РАН д.б.н. Г. Б. Боровским

³ Работа выполнена совместно с к.фарм.н. с.н.с. Я. А. Костыро

Как видно из таблицы 5, рассматриваемые соединения по острой токсичности относятся к 4 классу опасности. В целом, можно сделать вывод о том, что синтезированные водорастворимые производные изоксазолов являются перспективным рабочим материалом для создания антибактериальных агентов нового поколения.

ВЫВОДЫ

1. Циклоприсоединение нитрилоксидов к терминальным хлоралкенам – 2,3-дихлорпроп-1-ену, бис(2-хлораллил)сульфиду – региоспецифично приводит к 3,5-дизамещенным изоксазолам. В результате реакции нитрилоксидов с интернальными хлоралкенами – 1,3-дихлорпроп-1-еном и 1,3-дихлорбут-2-еном – образуется смесь региоизомеров, соотношение которых определяется структурой субстрата и нитрилоксида.

2. Разработан простой однореакторный способ получения широкого ряда 3-органил-5-(хлорметил)изоксазолов с высокими выходами на основе взаимодействия 2,3-дихлорпропена с альдоксимами при использовании в качестве окислителя N-хлорсукцинимида или системы оксон–NaCl–Na₂CO₃.

3. Предложен оптимальный способ синтеза симметричных бис(изоксазолилметил)-сульфидов, конденсацией которых с диэтилоксалатом в основно-каталитических условиях получены 2,5-бис(изоксазол-5-ил)-3,4-дигидрокситиофены с хорошими выходами.

4. Взаимодействием 5-(хлорметил)изоксазолов с (3-аминопропил)силатраном получены изоксазол-силатрановые гибриды, в структуру которых входит один или два изоксазольных цикла. Показано, что селективность реакции можно контролировать варьированием мольного соотношения реагентов.

5. Алкилированием аминокислот, тиомочевины, триэтанолamina, сульфаниловой кислоты 5-(хлорметил)изоксазолами получены неизвестные ранее водорастворимые производные изоксазолов.

6. Для изоксазол-силатрановых гибридов и других водорастворимых производных изоксазолов обнаружена высокая бактериостатическая активность в отношении тестовых непатогенных штаммов микроорганизмов (*E. Durans*, *B. Subtilis*, *E. Coli*). Первичная оценка токсичности некоторых найденных соединений-лидеров показала отсутствие острой токсичности (LD₅₀>6000 мг/кг, мыши, перорально), а их цитотоксичность не превышает таковую для известного изоксазол-содержащего антибиотика оксациллина.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Kondrashov E. V. Simple one-pot synthesis of 5-(chloromethyl)isoxazoles from aldoximes and 2,3-dichloro-1-propene / E. V. Kondrashov, **N. S. Shatokhina** // *Chem. Heterocycl. Compd.* – 2019 – № 55(12) – P. 1228–1232. DOI 10.1007/s10593-019-02606-2

2. Adamovich S. N. Isoxazole derivatives of silatrane: synthesis, characterization, in silico ADME profile, prediction of potential pharmacological activity and evaluation of antimicrobial action / S. N. Adamovich, E. V. Kondrashov, I. A. Ushakov, **N.S. Shatokhina**, E. N. Oborina, A. V. Vashchenko, L. A. Belovezhets, I. B. Rozentsveig, F. Verpoort // *Appl. Organomet. Chem.* – 2020. - аос.5976. DOI: 10.1002/аос.5976
3. Шилова А. Н. Усовершенствованный способ получения 5-(хлорметил)изоксазолов из альдоксимов и 2,3-дихлор-1-пропена / А. Н. Шилова, **Н. С. Шатохина**, Е. В. Кондрашов // *ЖОрХ* - 2022 Т. 58 № 10 С. 1123-1128. DOI 10.31857/S051474922210
4. Хлорметилизоксазолы из отходов производства эпихлоргидрина / **Н.С. Шатохина**, Е.В. Кондрашов // Проблемы теоретической и экспериментальной химии: Тезисы докладов XXIX Российской молодежной научной конференции с международным участием, посвященной 150-летию Периодической таблицы химических элементов. Уральский федеральный университет им. Первого Президента России Б.Н. Ельцина Екатеринбург 2019. – С. 413.
5. Усовершенствованный метод получения 5-хлорметилизоксазолов из отходов производства эпихлоргидрина / **Н.С. Шатохина**, Е.В. Кондрашов // XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Сборник тезисов в шести томах – Санкт-Петербург, 2019. – Т. 1. – С. 342.
6. Изотиуруниевые соли на основе изоксазола – новый тип блескообразователей в процессе электрохимического никелирования / Е.В. Верхотуров, **Н.С. Шатохина**, Н.Г. Сосновская // Международная научно-техническая конференция «Современные технологии и научно-технический прогресс». Сборник тезисов докладов. Ангарск, 2021. С. 23-24.
7. 5-(Хлорметил)изоксазолы – удобные строительные блоки для создания перспективных антибактериальных агентов / **Н.С. Шатохина**, Е.В. Кондрашов, Л.А. Беловежец // I Всероссийская школа-конференция по медицинской химии. Сборник тезисов докладов. Новосибирск, 2021 – С. 144.
8. Антимикробный потенциал новых водорастворимых производных изоксазола / Л. А. Беловежец, Е. В. Кондрашов, **Н. С. Шатохина** // 3-й Российский микробиологический конгресс. Сборник тезисов докладов. Псков, 2021 – С. 107.

Основные результаты получены с использованием материально-технической базы Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.